

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de  
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

## INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL DE *Bacillus* spp. DA REGIÃO AMAZÔNICA COMO ESTRATÉGIA PARA BIOCONTROLE DE *Aspergillus carbonarius* E SÍNTESE DE OCRATOXINA A EM UVAS

R.D. Silveira<sup>1</sup>, F.F. Veras<sup>1,2</sup>, A.A. Topor<sup>1</sup>, Vitor Manfroi<sup>3</sup>, A. Brandelli<sup>2</sup>, J.E. Welke<sup>1</sup>

1-Departamento de Ciências dos Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Laboratório de Toxicologia de Alimentos - CEP: 91501-970 – Porto Alegre – RS – Brasil – Telefone: (51) 3308-9788 – e-mail: (rafaela\_dsilveira@hotmail.com; juliane.welke@ufrgs.br)

2-Departamento de Ciências dos Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada - CEP: 91501-970 – Porto Alegre – RS – Brasil – Telefone: (51) 3308-6249

3-Departamento de Tecnologia dos Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Laboratório de Enologia - CEP: 91501-970 – Porto Alegre – RS – Brasil – Telefone: (51) 3308-9788

**RESUMO** – A ocorrência de fungos toxigênicos em uvas é comum, sendo que o controle destes microrganismos é feito principalmente com a aplicação de fungicidas sintéticos, os quais podem trazer diversas consequências negativas, incluindo o risco ocupacional e geração de resíduos no solo, rios e nas próprias uvas. Alternativas de biocontrole têm ganhado destaque na agricultura por serem práticas mais sustentáveis para o controle de pragas e doenças. O objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade de quatro cepas de *Bacillus* em inibir o desenvolvimento de *Aspergillus carbonarius* e a síntese de ocratoxina A (OTA), incluindo suas formas modificadas, em uvas Chardonnay. Todas as cepas apresentaram atividade antifúngica, com destaque para a cepa P1, que apresentou 100% de inibição fúngica e da síntese de OTA e de suas formas modificadas em uvas.

**ABSTRACT** – The occurrence of toxigenic fungi in grapes is common, and the control of these microorganisms is done mainly with the application of synthetic fungicides, which can bring several negative consequences, including occupational risk and waste generation in the soil, rivers and in grapes. Biocontrol alternatives have gained prominence in agriculture as they are more sustainable practices for the control of pests and diseases. The objective of this work was to evaluate the ability of four strains of *Bacillus* to inhibit the development of *Aspergillus carbonarius* and the synthesis of ochratoxin A (OTA), including their modified forms, in Chardonnay grapes. All strains showed antifungal activity, especially the strain P1, which showed 100% fungal inhibition and synthesis of OTA and its modified forms in grapes.

**PALAVRAS-CHAVE:** biocontrole, *Aspergillus carbonarius*, uvas, *Bacillus*

**KEYWORDS:** biocontrol, *Aspergillus carbonarius*, grapes, *Bacillus*

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br



## 1. INTRODUÇÃO

A viticultura é uma atividade econômica recente no Brasil, e o Rio Grande do Sul é o principal estado produtor de uvas para processamento (Embrapa, 2003), contribuindo com aproximadamente 90% da produção nacional de uvas destinada à produção de vinhos. Um dos problemas enfrentados pelos viticultores é a ocorrência de fungos filamentosos que comprometem a qualidade das uvas. O fungo toxigênico *Aspergillus carbonarius* é um dos principais responsáveis pela ocorrência de ocratoxina A (OTA) em uvas. A OTA é uma micotoxina classificada como possivelmente carcinogênica para humanos (grupo 2B) pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 1993). Além disso, a exposição à OTA está relacionada a efeitos genotóxicos, imunossupressores, nefrotóxicos, hepatotóxicos, neurotóxicos e teratogênicos (CIMBALO; FONT; MANYES, 2020). Há também as formas modificadas da OTA, que podem ser formadas tanto pelo fungo quanto pela planta, como um mecanismo de defesa, através de hidrólise, oxidação, redução ou conjugação com moléculas orgânicas. As micotoxinas modificadas podem ser convertidas para sua forma livre, apresentando risco toxicológico (FREIRE; SANT'ANA, 2018).

Na produção convencional de uvas, o controle fúngico é realizado através da aplicação de fungicidas sintéticos. O uso desses pesticidas pode trazer diversas consequências negativas, como: geração de cepas mais resistentes na população de fitopatógenos, alteração do perfil volátil e da composição fenólica das uvas, levando também à contaminação do solo e da água. Além disso, a exposição ocupacional aos fungicidas sintéticos tem sido epidemiologicamente associada ao desenvolvimento de Parkinson (NARAYAN et al., 2017) e leucemia mieloide (PATEL et al., 2019).

Cabe destacar também o uso da calda bordalesa (mistura de sulfato de cobre, cal e água) como agente antifúngico na viticultura convencional e orgânica. O uso desse produto em quantidades exacerbadas acarreta no acúmulo de cobre no solo dos vinhedos em todo o mundo, o que pode provocar danos às raízes, dificultando a absorção de nutrientes, além de reduzir a taxa fotossintética e, conseqüentemente, retardar o desenvolvimento da videira (BORTOLUZZI et al., 2019).

O biocontrole consiste na utilização de microrganismos seguros para a inibição do desenvolvimento patogênicos e tem sido proposto como uma alternativa ao uso de pesticidas sintéticos. Um exemplo é a utilização de bactérias do gênero *Bacillus*, que apresentam diversas vantagens, como: alta taxa de crescimento, capacidade de formar endósporos e de sintetizar compostos antimicrobianos (lipopeptídeos, enzimas e sideróforos) (CALVO et al., 2019; CAULIER et al., 2019). Veras et al. (2016) demonstraram que *Bacillus* isolados de peixes da região amazônica foram eficazes contra fungos toxigênicos, porém nenhuma forma de aplicação desta bactéria foi investigada. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de cepas *Bacillus* em inibir o desenvolvimento de *A. carbonarius* e síntese de OTA em uvas.

## 2. MATERIAL MÉTODOS

### 2.1 Microrganismos e preparo dos inóculos

Foram utilizadas quatro cepas de *Bacillus* (P1, P7, P11 e P45) descritas em trabalho anterior como as mais promissoras contra fungos toxigênicos *in vitro* (VERAS et al., 2016). Os inóculos bacterianos foram cultivados em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) a 37°C, 125 rpm durante 48 horas. A concentração de células viáveis foi determinada pela contagem de unidades formadoras de colônias em meio BHI e ajustada para 10<sup>9</sup> UFC mL<sup>-1</sup> em solução salina.

*Aspergillus carbonarius*, por sua vez, foi cultivado em meio *Potato Dextrose Agar* (PDA) por 7 dias a 25°C. Os esporos foram colhidos pela adição de solução esterilizada de Tween 80 (0,1%; v/v) e sua concentração foi determinada em câmara de Neubauer e ajustada para 10<sup>3</sup> esporos mL<sup>-1</sup>.

### 2.2. Uvas



Foram utilizadas uvas da espécie *Vitis vinifera* (cultivar Chardonnay), colhidas em 2019 na cidade de Canela, Rio Grande do Sul, Brasil (29°21'56.4"S 50°46'06.6"W). As uvas foram submetidas à sanitização de acordo com Lappa et al. (2018).

### 2.3. Avaliação do efeito inibitório das cepas de *Bacillus* sobre *A. carbonarius* em uvas

As uvas foram imersas por 2 minutos na suspensão de *Bacillus* para cada tratamento bacteriano. Após 1 hora secando, as uvas foram submersas na suspensão de esporos. Nas uvas do controle positivo (inoculada apenas com *A. carbonarius*), a suspensão de *Bacillus* foi substituída por água destilada, e nas uvas do controle negativo (ausência de microrganismos) ambas suspensões de microrganismos foram substituídas por água destilada. As uvas foram colocadas em placas de Petri e mantidas em estufa a 30°C por 7 dias (LAPPA et al., 2018).

As uvas foram inspecionadas visualmente para determinar a porcentagem de infestação fúngica. Adicionalmente, bagas foram selecionadas aleatoriamente, maceradas e homogeneizadas em solução de água peptonada a 0,1%. Em seguida, foram realizadas diluições sucessivas e uma alíquota (100µL) de cada diluição foi inoculada em placas contendo meio Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol (DRBC). Após incubação das placas a 25°C por 5 dias, realizou-se a contagem de colônias e os resultados foram expressos em UFC mL<sup>-1</sup> (Jiang et al., 2014).

### 2.4. Extração de OTA e suas formas modificadas em uvas

Os metabólitos fúngicos foram extraídos das uvas com acetonitrila:ácido fórmico 0,1% (v/v) e injetados em equipamento de cromatografia líquida (LC, Shimadzu, Japão) acoplada a detector de espectrometria de massas por tempo de voo e ionização por eletrospray (ESI-QTOF-MS, Bruker Daltonics, micrOTOF-Q III, EUA). A análise foi feita em coluna C<sub>18</sub> (Kinetex Core-Shell Technology 2.6 µ F5 100 A, EUA), usando como fase móvel água MilliQ:ácido acético:acetato de amônia e acetonitrila:ácido acético:acetato de amônia com fluxo de 0,4 mL min.<sup>-1</sup> Os compostos foram identificados através do tempo de retenção, massa protonada e padrão de fragmentação.






## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Efeito inibitório das cepas de *Bacillus* sobre *A. carbonarius* em uvas

As quatro cepas de *Bacillus* utilizadas nesse estudo apresentaram efeito inibitório contra *A. carbonarius*. A cepa P1 mostrou ser a mais promissora, com 100% de inibição do desenvolvimento fúngico em uvas. Nas uvas tratadas com a cepa P1, observou-se a ausência de colônias fúngicas nas placas de DRBC. Por outro lado, no controle positivo (uvas inoculadas apenas com *A. carbonarius*), foi possível verificar um total de 8,8 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. As cepas P7, P11 e P45 apresentaram 58, 75 e 25% de inibição, respectivamente (Tabela 1).

Em estudo conduzido por Veras et al. (2016), essas quatro cepas apresentaram atividade antifúngica *in vitro* contra os seguintes fungos produtores de micotoxinas: *Aspergillus parasiticus*, *A. carbonarius*, *Penicillium citrinum*, *P. chrysogenum*, *Fusarium graminearum* e *Monascus purpureus*. Porém, esse é o primeiro estudo no qual avaliou a capacidade dessas cepas em inibir o desenvolvimento de *A. carbonarius* em uvas. Em contrapartida, Chen et al. (2019) observaram que as cepas de *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* e *B. subtilis* foram capazes de inibir um fitopatógeno chamado *Botrytis cinerea* em uvas,. Os mecanismos de ação atribuídos a esse efeito inibitório foram a formação de biofilme, competição por ferro, síntese de compostos orgânicos voláteis, de enzimas e de lipopeptídeos.

Tabela 1 – Avaliação das cepas de *Bacillus* ( $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>) como estratégia de biocontrole de *Aspergillus carbonarius* em uvas.

<i>Bacillus</i> spp.	Contagem fúngica (UFC mL <sup>-1</sup> )	Inibição fúngica (%)	Imagens
P1	ND <sup>a</sup>	100	
P7	$3,2 \cdot 10^4 \pm 2,5 \cdot 10^3$	58	
P11	$3,2 \cdot 10^3 \pm 3,5 \cdot 10^2$	75	
P45	$3,4 \cdot 10^6 \pm 5,6 \cdot 10^5$	25	
Controle (uvas sem inoculação de <i>Bacillus</i> )	$8,8 \cdot 10^6 \pm 4,0 \cdot 10^5$	0	

<sup>a</sup> Não detectado

### 3.2. Efeito inibitório das cepas de *Bacillus* sobre a síntese de OTA em uvas

A OTA e suas formas modificadas foram identificadas no controle positivo (Tabela 2) através do seu tempo de retenção, massa protonada, e padrão de fragmentação. OTA foi quantificada em todas amostras utilizando curva analítica expressa em  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

Tabela 2 – Identificação da OTA e de suas formas modificadas produzidas por *Aspergillus carbonarius* nas uvas através de LC-MS/MS.

Micotoxina	Fórmula molecular	T <sub>R</sub> (min) <sup>a</sup>	Massa monoisotópica	m/z do íon precursor e modo	MS <sup>2</sup> (+) (m/z)
$\alpha$ -Ocratoxina	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> ClO <sub>5</sub>	1,0	256,0139	294,9776 [M+K] <sup>+</sup>	276; 258; 136
Ocratoxina A	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> ClNO <sub>6</sub>	2,5	403,0823	404,0901[M+H] <sup>+</sup>	358; 257; 120
Ocratoxina B	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>6</sub>	3,0	369,1212	387,1556 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	371; 301; 105
Ocratoxina A metil-éster	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> ClNO <sub>6</sub>	3,8	417,0979	418,1057 [M+H] <sup>+</sup>	401; 329; 201

<sup>a</sup> Tempo de retenção em minutos.

O efeito das cepas de *Bacillus* sobre a síntese de OTA, incluindo as formas modificadas, é demonstrado na Tabela 3. Todas as cepas foram capazes de reduzir os níveis de OTA nas uvas. A cepa P1 demonstrou mais uma vez ser a cepa mais promissora para o controle fúngico, apresentando 100% de inibição da síntese de OTA bem como das formas modificadas desta micotoxinas.

Tabela 3 – Efeito das cepas de *Bacillus* na síntese de OTA e suas formas modificadas em uvas.

Micotoxina ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	<i>Bacillus</i> sp.	Controle
--------------------------------------	---------------------	----------



	P1	P7	P11	P45	positivo
$\alpha$ -Ocratoxina <sup>b</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	0,47 ± 0,03	0,35 ± 0,04	43,20 ± 3,20
Ocratoxina A	ND <sup>a</sup>	0,30 ± 0,01	0,27 ± 0,00	0,36 ± 0,01	15,21 ± 1,27
Ocratoxina B <sup>b</sup>	ND <sup>a</sup>	0,91 ± 0,00	0,40 ± 0,02	0,52 ± 0,15	8,40 ± 0,45
Ocratoxina A metil-éster <sup>b</sup>	ND <sup>a</sup>	0,30 ± 0,02	ND <sup>a</sup>	0,50 ± 0,014	1,88 ± 0,07

<sup>a</sup> Não detectado; <sup>b</sup> Quantificado como equivalente de OTA.

As formas modificadas ocratoxina B e ocratoxina A metil-éster foram produzidas pelo *A. carbonarius* nas amostras de uva que receberam o tratamento de biocontrole com as cepas de *Bacillus* P7, P11 e P45. Por outro lado, a  $\alpha$ -ocratoxina foi produzida apenas nas uvas tratadas com as cepas P11 e P45.

#### 4. CONCLUSÕES

As cepas de *Bacillus* apresentam potencial para uso como agente de controle biológico em uvas para evitar ou reduzir a ocorrência de *A. carbonarius*, bem como a síntese de OTA e suas formas modificadas. Estudos sobre a identificação dessas cepas em nível de espécie estão em andamento.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo suporte financeiro e bolsas de estudo.

#### 6. REFERÊNCIAS

- BORTOLUZZI, E. C; KORCHAGIN, J; MOTERLE, D; SANTOS, D; CANER, L. Accumulation and precipitation of Cu and Zn in a centenarian vineyard. **Soil Science Society of America Journal**, v. 83, n. 2, p. 492–502, 2019.
- CALVO, H; Mendiara, I; Arias, E; Blanco, D; Venturini, M.E. The role of iturin A from *B. amyloliquefaciens* BUZ-14 in the inhibition of the most common postharvest fruit rots. **Food Microbiology**, v. 82, n. January, p. 62–69, 2019.
- CAULIER, S; NANNAN, C; GILLIS, A; LICCIARDI, F; BRAGARD, C; MAHILLON, J. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. FEB, p. 1–19, 2019.
- CHEN, X. WANG, Y; GAO, Y; GAO, T; ZHANG, D. Inhibitory abilities of *Bacillus* isolates and their culture filtrates against the gray mold caused by *Botrytis cinerea* on postharvest fruit. **Plant Pathology Journal**, v. 35, n. 5, p. 425–436, 2019.
- CIMBALO, A.; FONT, G.; MANYES, L. Toxicity of mycotoxins in vivo on vertebrate organisms: A review. **Food and Chemical Toxicology**, p. 111161, 2020.
- Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). 2003. **Uvas viníferas para processamento em regiões de clima temperado.** Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasViniferasRegioesClimaTemperado/mercado.htm>>. Embrapa, 2003.
- FREIRE, L.; SANT'ANA, A. S. Modified mycotoxins: An updated review on their formation, detection, occurrence, and toxic effects. **Food and Chemical Toxicology**, v. 111, n. November 2017, p. 189–205, 2018.

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de  
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

IARC (International Agency for Research on Cancer). **Monographs on evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins.** IARC, 1993. 571p.

JIANG, C; SHI, J; LIU, Y; ZHU, C. Inhibition of *Aspergillus carbonarius* and fungal contamination in table grapes using *Bacillus subtilis*. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 41–48, 2014.

LAPPA, I. K; MPARAMPOUTI, S; LANZA, B; PANAGOU, E. Control of *Aspergillus carbonarius* in grape berries by *Lactobacillus plantarum*: A phenotypic and gene transcription study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 275, n. January, p. 56–65, 2018.

NARAYAN, S; LIEW, Z; BRONSTEIN, J; RITZ, B. Occupational pesticide use and Parkinson's disease in the Parkinson Environment Gene (PEG) study. **Environment International**, v. 107, n. October 2016, p. 266–273, 2017.

PATEL, D. M.; JONES, R; BOOTH, B; OLSSON, A; KROMHOUT, H; STRAIF, K; VERMEULEN, R; TIKELLIS, G; PALTIEL, O; GOLDING, J; NORTHSTONE, K; STOLTENBERG, C; HABERG, S; SCHUZ, J; FRIESEN, M; PONSONBY, A.L.; LEMESHOW, S; LINET, M; MAGNUS, P; OLSEN, J; OLSEN, S; DWYER, T; STAYNER, L; WARD, M. Parental occupational exposure to pesticides, animals and organic dust and risk of childhood leukemia and central nervous system tumors: Findings from the International Childhood Cancer Cohort Consortium (I4C). **International Journal of Cancer**, 2019.

VERAS, F. F.; CORREA, A; WELKE, J.E.; BRANDELLI, A. Inhibition of mycotoxin-producing fungi by *Bacillus* strains isolated from fish intestines. **International Journal of Food Microbiology**, v. 238, p. 23–32, 2016.

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br